

PCT/KR 99/00265

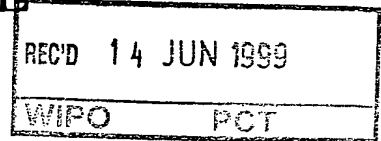
29.5.1999

ETU

HR 99/265

대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 1998년 특허출원 제46547호
Application Number

출원년월일 : 1998년 10월 31일
Date of Application

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

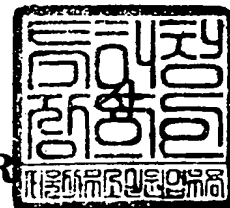
출원인 : 한국과학기술연구원 외1
Applicant(s)



1999년 5월 19일

특허청

COMMISSIONER



특허출원서

【출원번호】 98-046547

【출원일자】 1998/10/31

【발명의 국문명칭】 파피아 로도지마 형질전환용 벡터 및 그 형질전환 방법

【발명의 영문명칭】 A vector for Phaffia rhodozyma and its transformation method

【출원인】

【국문명칭】 한국과학기술연구원

【영문명칭】 Korea Institute of Science and Technology

【대표자】 박원훈

【출원인코드】 37500048

【출원인구분】 각급 시험 연구기관

【우편번호】 136-130

【주소】 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1번지

【국적】 KR

【출원인】

【국문명칭】 해태제과 주식회사

【영문명칭】 Haitai Confectionery Co., Ltd.

【대표자】 박인배

【출원인구분】 국내상법상법인

【우편번호】 150-105

【주소】 서울특별시 영등포구 양평동5가 108-2

【국적】 KR

【대리인】

【성명】 이원희

【대리인코드】 H360

【전화번호】 02-3453-0507

【우편번호】 135-080

【주소】 서울특별시 강남구 역삼동 642-16(성지하이츠 II 805호)

【발명자】

【국문성명】 최의성

【영문성명】 CHOI, Eui-Sung

【주민등록번호】 540923-1037424

【우편번호】 305-335

【주소】 대전광역시 유성구 궁동 395-3 다솔아파트 102동 507호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 이상기

【영문성명】 RHEE, Sang-Ki

【주민등록번호】 510605-1010411

【우편번호】 143-210

【주소】 서울특별시 광진구 광장동 극동빌라 가동 101호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 손정훈

【영문성명】 SOHN, Jung-Hoon

【주민등록번호】 610728-1674115

【우편번호】 302-280

【주소】 대전광역시 서구 월평동 누리아파트 103동 506호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 박수동

【영문성명】 PARK, Soo-Dong

【주민등록번호】 700206-1455110

【우편번호】 305-345

【주소】 대전광역시 유성구 신성동 153 하나아파트 109동 1305호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 이윤형

【영문성명】 LEE, Yun Hyoung

【주민등록번호】 481204-1063611

【우편번호】 435-040

【주소】 경기도 군포시 산본동 묘향아파트 933동 1503호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 이승재

【영문성명】 LEE, Seung Jae

【주민등록번호】 481201-1041619

【우편번호】 422-240

【주소】 경기도 부천시 소사구 심곡본동 566-1 부천아파트 7동 205호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 장재권

【영문성명】 JANG, Jae Kweon

【주민등록번호】 631123-1024615

【우편번호】 138-190

【주소】 서울특별시 송파구 석촌동 229-8

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 최석근

【영문성명】 CHOI, Seok Keun

【주민등록번호】 680515-1794510

【우편번호】 131-208

【주소】 서울특별시 중랑구 면목8동 10번지 진로아파트 503호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 손영록

【영문성명】 SON, Young Rok

【주민등록번호】 710614-1094114

【우편번호】 135-240

【주소】 서울특별시 강남구 개포동 13-3 나산미시 860 오피스텔 919호

【국적】 KR

【신규성주장】

【공개형태】 2. 간행물 발표

【공개일자】 1998.05.31

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

이원희 (인)

【심사청구】 특허법 제60조의 규정에 의하여 위와 같이 출원심사를 청구합니다.

대리인

이원희 (인)

【수신처】 특허청장 귀하

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 14 면 14,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 8 항 365,000 원

【합계】 408,000 원

【첨부서류】 1. 요약서, 명세서(및 도면) 각 1통

2. 출원서 부분, 요약서, 명세서(및 도면)을 포함하는 FD부분 1통

3. 위임장(및 동 번역문) 1통

4. 위임장(및 동 번역문) 1통(추후제출)(해태제과)

5. 신규성증명서(및 동 번역문) 각 1통

6. 미생물기탁증(및 동 번역문) 각 1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 *파피아 로도지마* (*Phaffia rhodozyma*) 균주에 사용되는 새로운 형질전환용 벡터 및 이를 이용한 형질전환 방법에 관한 것으로서, 상세하게는 *파피아 로도지마* 유래의 리보솜 단백질 L41 유전자, 시클로헥시미드 (cycloheximide) 저항성 돌연변이가 유발된 L41 유전자, *파피아 로도지마* 유래의 리보솜 유전자, 상기 L41 유전자 및 리보솜 유전자를 포함하는 형질전환용 벡터 그리고 이를 *파피아 로도지마* 균주에 일렉트로포레이션 과정으로 형질전환시키는 방법으로 구성되며, 본 발명의 벡터 및 형질전환 방법은 *파피아 로도지마*를 유전적으로 안정하게 형질전환시킴으로써 천연색소 아스타잔틴의 산업적인 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

【대표도】

도 2

【명세서】

【발명의 명칭】

파피아 로도지마 형질전환용 벡터 및 그 형질전환 방법

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 파피아 로도지마 유래의 리보솜 단백질 L41 유전자의 염기 서열 및 이로부터 유추한 아미노산 서열을 나타낸 것이고,

오픈박스 : TATA 및 CAAT 염기 서열; 밑줄 : 프라이머 위치;

굵은 체 : 인트론 스플라이싱 부위에 존재하는 유사 (consensus) 염기 서열;

○ : 56번째 아미노산

도 2 는 파피아 로도지마 유래의 L41 유전자를 그 리보솜 유전자의 제한효소 *BalI* 부위에 삽입하는 벡터의 제작 과정 및 그 제한효소 지도를 나타낸 것이고,

■ : L41 유전자의 엑손 (exon) 부위 ; → : 유전자의 전사 방향;

도 3 은 본 발명의 형질전환용 벡터로 형질전환시킨 파피아 로도지마 균주에서 그 벡터의 삽입 여부와 유전자 사본수를 조사하는 서던 블롯을 수행한 결과를 나타낸 것이고,

도 4 는 본 발명의 벡터 pTPLR1 을 개환하여 형질전환시키는 경우 염색체 내로 벡터 상의 유전자가 삽입되는 과정을 모식도로 나타낸 것이고,

도 5 는 파피아 로도지마를 형질전환시키는 과정에서 저항 (Ω), 전압 (V, voltage), 용량 (μF) 등의 조건이 세포 생존률 및 형질전환 효율에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 *파피아 로도지마* (*Phaffia rhodozyma*) 균주에 사용되는 새로운 형질전환용 벡터 및 이를 이용한 형질전환 방법에 관한 것으로서, 상세하게는 천연색소 아스타잔틴의 생산에 유용한 균주인 *파피아 로도지마* 유래의 리보솜 단백질 L41 유전자, 시클로헥시미드 (cycloheximide) 저항성 돌연변이가 유발된 L41 유전자, *파피아 로도지마* 유래의 리보솜 유전자, 상기 L41 유전자와 리보솜 유전자를 포함하여 *파피아 로도지마*를 안정하게 형질전환시키는 벡터 및 그의 형질전환 방법에 관한 것이다.

파피아 로도지마 (*Phaffia rhodozyma*)는 산업적으로 유용한 천연색소인 아스타잔틴 (astaxanthin)을 생산하는 붉은 색을 띄는 효모 균주이다. 아스타잔틴은 비타민 A의 전구물질인 베타-카로틴으로 대표되는 카로티노이드계에 속하는 물질로서, 갑각류, 송어 및 연어의 주요 색소 성분 등으로 자연계에 널리 분포되어 있다. 그러나 아스타잔틴은 연어, 송어, 새우 등에서 직접 생합성되지는 않으므로 반드시 먹이사슬에 의하여 섭취되어야 한다. 따라서 이들 어류 및 갑각류를 양식하는 경우에 상품 가치를 높이기 위하여 아스타잔틴 색소를 첨가하는 것이 필요한데, 이는 상품이 주홍색을 띄게 하여 소비자의 눈길을 끌고 좋은 향미도 제공하는 효과가 있다. 또한, 이 카로티노이드계 색소는 동물뿐만 아니라 사람에게도 중요한 생리대사적 역할을 하고, 실제로 비타민 A의 전구체, 면역기능의 활성화, 불포화 산소의 제

거, 암 및 노화 예방 등의 효과가 알려져 있다.

최근 아스타잔틴의 생산과 관련하여 *파피아 로도지마*에 관심이 모아지면서 그 발효 배양에 대한 연구가 활발히 보고되고 있다. 그러나 지금까지의 연구는 값싼 배지 원료를 효율적으로 사용하는 방향으로 이루어졌고, 지역적 특성에 따라 다양한 부산물을 이용하는 배양법이 주로 개발되었다. 실제 알팔파 주스 (Okagbue, *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 33, 1984), 당밀 (Haard, *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 10, 609, 1988), 포도 주스 가공부산물 (Lango, *et al.*, *Biotech. Forum Europe*, 9, 565, 1992), 이탄 수산화산물 (peat hydrolyzate; Martin, *et al.*, 58, 223, 1993), 옥수수 제분 부산물 (corn wet-milling; Hayman *et al.*, *J. Ind. Microbiol.*, 14, 389, 1995), 그리고 사탕수수즙, 요소 및 인산의 혼용 (Fontana, *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 57/58, 413, 1996) 등을 이용한 배양법에 관한 연구가 보고되어 있다.

또한 *파피아 로도지마*에 관하여 그 생리적 특성 및 색소 고생산성 돌연변이주의 선별 등의 연구가 최근 보고된 바 있으나, 아직까지 이 균주의 유전학적 측면에서의 연구는 많이 이루어지지 않았다 (Johnson, *et al.*, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11, 297, 1991; An, *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 116, 1989; Chumpolkulwong, *et al.*, *J. Ferment. Bioeng.*, 75, 375, 1997; Lewis, *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2944, 1990) .

최근 들어 *파피아 로도지마*의 배수성 (ploidy)과 생식 사이클 (sexual cycle)에 관한 유전학적 측면의 연구가 시작되어 그 결과가 보고되고 있다. 구체적으로 칼로-

마타와 존슨 등이 유동 세포측정방법 (flow cytometry)으로 여러 *파피아 로도지마* 균주의 배수성을 조사하여, 이들 균주는 반수체 상태로 존재하는 경우는 거의 없고 대부분 배수체 (polyploid) 상태로 존재함을 보고하였다 (Calo-Mata, *et al.*, *Yeast Gen. Mol. Biol. Meet.*, 126, 1996). 이외에 *파피아 로도지마*에 페도가믹 생식 과정 (pedogamic sexual process)이 존재하는 것도 알려졌다 (Golubev, *et al.*, *Yeast*, 11, 101, 1995).

한편, *파피아 로도지마*는 아스타잔틴 등의 상업적 생산에 유용함에도 불구하고 야생형인 경우에 색소 함량이 매우 낮으므로, 현재 *파피아 로도지마*에 관하여 색소 고생산성 돌연변이주를 개발하는데 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나 균주 내의 색소 함량이 일정 수준 이상으로 높아지면 균체 성장률이 낮아지면서 유전적으로 불안정해지는 부작용이 나타나므로 색소 고생산성 균주를 얻는 것은 매우 어렵다. 또한 아스타잔틴의 생산과 관련된 *파피아 로도지마* 유래의 돌연변이주를 개발하기 위하여 국내외 연구기관 및 기업은 주로 전통적 균주 개량방법인 화학적 돌연변이 유발방법을 사용하는데, 균주의 색소 함량을 증가시키는 돌연변이의 경우 원하지 않는 부위의 유전자도 동시에 손상되어 균체의 성장률이 저조해지고 발효 배양시 유도기가 길어지는 등의 다상유전 효과 (pleiotropic effect)가 유발되는 문제점이 있다. 이와 같은 색소 고생산성 돌연변이주는 유전적으로도 불안정하여 세대 배양에 따라 색소 생산성이 퇴화되기도 한다.

이러한 전통적 균주 육종방법 상의 단점을 근본적으로 해결하고 *파피아 로도지마*의 이용성을 극대화하기 위하여, 최근 유전학적 형질전환 방법으로 균주를 개량하려는

분자 육종에 관한 연구가 시작되고 있다. 그러나 대부분의 *파피아* *로도지마* 균주는 다핵성 (polyploid)이고 효모에서 통상적으로 사용되는 방법으로 영양요구성 변이주를 얻는 것이 매우 어려우므로, 항생제 내성 표지 유전자를 사용하는 방향으로 연구가 진행되는 것이 유리하다. 그러나 *파피아* *로도지마* 균주의 특성 상 최근에 들어서야 재현성 있는 유전학적 형질전환으로서 *파피아* *로도지마* 균주 유래의 액틴 프로모터와 세균의 G418 항생제 내성 표지 유전자를 사용하는 방법이 보고되었을 뿐이고, 이 또한 효율이 낮은 단점이 있었다 (Wery, et al., *Gene*, 184, 89, 1997).

한편 효모를 포함한 진핵생물 (eucaryotes)에만 작용하는 항생물질인 시클로헥시미드는 다양한 효모 균주의 형질전환에서 선별 표지로서 이용될 수 있다. 시클로헥시미드는 진핵세포 리보솜의 공여부위 (aminoacyl-tRNA 결합부위, A site)를 표적 (target)하여 전이 (translocation) 과정을 방해함으로써 세포의 성장과 단백질 생성을 저해하지만, 클로로플라스트 (chloroplast) 또는 미토콘드리아 (mitochondria) 등의 세포 소기관에는 전혀 영향을 주지 않는 특성이 있다. 특히 시클로헥시미드는 리보솜 단백질 L41 과 반응하고 L41 유전자의 돌연변이에 의하여 시클로헥시미드 저항성이 부여될 수 있다고 알려져 있어, 리보솜 단백질과 함께 효모의 유전공학적 형질전환 방법에 널리 이용될 수 있다.

실제로 리보솜 단백질 L41 유전자는 최근 *사카로마이세스 세레비시에* (*Saccharomyces cerevisiae*) 등에서 표지 유전자 (marker)로 이용되고 있는데, 다카기 (Takagi)에 의해 처음 클로닝된 *사카로마이세스 세레비시에*의 L41 유전자는

아미노산 치환에 의하여 시클로헥시미드 저항성을 나타낼 수 있으므로 표지 유전자의 개발에 유용하다 (Takagi, et al., *J. Bacteriol.*, 417, 168, 1986; Kawai, et al., *J. Bacteriol.*, 174, 254-262, 1992). 또한, 뮈토 등도 효모 *캔디다 말토사* (*Candida maltosa*)의 리보솜 단백질 L41 유전자를 표지 유전자로 이용한 유전공학 적 도구를 제시한 바 있었다 (Mutoh, et al., *J. Bacteriol.*, 5383, 177, 1995). *캔디다 유틸리스*의 경우에도 *파피아 로도지마*와 동일하게 상기 리보솜 단백질 56번째 아미노산의 치환에 의해 시클로헥시미드에 대한 저항성을 나타내는 것으로 알려져 이를 이용한 형질전환 시스템이 개발된 바 있었다 (Keiji Kondo et al., *J. Bacteriol.*, 7171, 177, 1995). 또한, 이와 유사한 연구가 *클루이베로마이세스 락티스* (*Kluyveromyces lactis*)와 *스완니노마이세스 옥시덴탈리스* (*Schwanninomyces occidentalis*)에서도 보고된 바 있었다 (Dehoux, et al., *Eur. J. Biochem.*, 213, 841-843, 1993; Pozo, et al., *Eur. J. Biochem.*, 213, 849-857, 1993). 한편 조류의 일종인 *테트라하이메나* (*Tetrahymena*)의 경우는 40번째 아미노산이 메치오닌으로 구성되고, 이를 글루타민으로 치환하는 경우 시클로헥시미드에 대한 저항성이 나타난다고 보고되어 이것도 유전공학적 표지 유전자로 이용하는 시도가 이루어졌다 (Roberts, et al., *Exp. Cell. Res.*, 312, 81, 1973).

이러한 상황에서 본 발명자들은 *파피아 로도지마* 균주를 유전적으로 안정하고 용이하게 형질전환시키는 방법을 개발하기 위하여, 염색체 내로 외래 유전자를 안정적으로 삽입하는 유도 (targeting) 유전자와 항생제 내성 유전자를 포함하는 형질전환용 벡터를 제작하고 이를 *파피아 로도지마*와 동일한 바시디오미세토우스

(Basidiomycetous) 계통의 효모인 크립토코커스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*)에서 사용된 형질전환 방법을 활용하여 파피아 로도지마에 형질전환시키고자 시도하였다 (Kim, et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1947, 1998).

우선 본 발명자들은 파피아 로도지마 유래의 리보솜 단백질 L41 유전자를 클로닝하여 그 염기 서열을 결정하고, 이로부터 시클로헥시미드 저항성에 관여하는 부위를 돌연변이시킨 표지 유전자를 얻은 다음 이를 파피아 로도지마의 리보솜 유전자와 함께 삽입한 형질전환용 벡터를 제작하여 일렉트로포레이션 방법으로 파피아 로도지마에 형질전환시키고 상기 벡터가 염색체 내로 삽입됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명은 파피아 속 효모의 리보솜 단백질 L41 유전자를 이용한 항생제 내성을 가지는 형질전환용 벡터 및 그 형질전환 방법을 제공함에 그 목적이 있다.

【발명의 구성 및 작용】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 파피아 로도지마 (*Phaffia rhodozyma*) 유래의 리보솜 단백질을 코딩하는 L41 유전자를 제공한다.

구체적으로, 정상 L41 유전자 및 리보솜 단백질의 56번 아미노산이 글루타민으로 치환되어 시클로헥시미드 저항성 돌연변이가 유발된 L41 유전자를 제공한다.

또한, 본 발명은 비전사 서열 부위를 포함하는 파피아 로도지마 유래의 리보솜 유전자를 제공한다.

또한, 본 발명은 파피아 로도지마 유래의 리보솜 유전자 및 시클로헥시미드

(cycloheximide) 저항성 유전자를 포함하는 *파피아 로도지마* 형질전환용 벡터를 제공한다.

구체적으로, 본 발명은 리보솜 유전자는 비전사 서열 부위이고 시클로헥시미드 저항성 유전자는 리보솜 단백질의 56번 아미노산이 치환된 L41 유전자인 *파피아 로도지마* 형질전환용 벡터 pTPLR1 (수탁번호 : KCTC 0535 BP)을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 *파피아 로도지마* 형질전환용 벡터 및 일렉트로포레이션 과정을 이용하여 *파피아 로도지마* 균주를 형질전환시키는 방법을 제공한다.

이 때 상기 형질전환용 벡터는 제한효소 등으로 개환시키는 것이 바람직하고, 일렉트로포레이션은 0.8 ~ 1.2 kV, 400 ~ 800 Ω , 25 ~ 50 μ F 조건에서 수행하는 것이 바람직하다.

이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 *파피아* 속 효모 유래의 리보솜 단백질을 코딩하는 L41 유전자를 제공한다. 구체적으로 본 발명은 *파피아 로도지마* (*Phaffia rhodozyma*)의 리보솜 단백질인 L41의 게놈 유전자 및 cDNA 유전자를 중합효소 연쇄반응 등으로 분리한다. 이 때 *파피아 로도지마* 균주로는 ATCC 24230 균주 등을 사용한다.

본 발명의 리보솜 단백질 L41 유전자는 다른 효모 균주의 L41 유전자와 염기 서열이 유사하지만, 6개의 인트론이 포함되고, 인트론의 5' 시작 부위 및 3' 말단 부위에 특이 서열이 존재한다 (서열목록 참조). 상기 L41 유전자는 1,223 bp 크기로 구성되고 서열 1의 게놈 유전자 염기 서열을 가지며 서열 2의 cDNA 염기 서열을 포함하고, 106개의 아미노산으로 이루어진 서열 3의 아미노산 서열을 가지는 단백질

을 코딩하며, 리보솜 단백질 중 시클로헥시미드 민감성에 관여하는 프롤린은 아미노산 56번 위치에 존재한다 (도 1 참조).

또한, 본 발명은 시클로헥시미드 저항성을 가지는 돌연변이가 유발된 L41 유전자를 부위지정 변이법 (site directed mutagenesis)으로 얻는다. 구체적으로 시클로헥시미드 민감성에 관여하는 56번 아미노산인 프롤린을 글루타민으로 치환시키는 변이 (mutagenesis)를 수행하여 형질전환체의 선별에 사용될 수 있는 L41 표지 유전자를 제작한다 (도 2 참조).

또한, 본 발명은 비전사 서열 (non-transcription sequence, NTS) 부위를 포함하는 *파피아* 속 효모 유래의 리보솜 유전자를 제공한다. 구체적으로 본 발명은 상기 비전사 서열 부위가 서열 4 의 염기 서열을 포함하는 리보솜 유전자를 분리한다.

본 발명은 상기 시클로헥시미드 저항성 유전자를 이용하여 *파피아* 속 효모 균주에 효율적으로 사용될 수 있는 형질전환용 벡터를 제작한다. 이 때 *파피아* 속 효모로 형질전환된 유전자가 게놈 유전자 내로 삽입되는 효율을 높이기 위하여, 리보솜 유전자 등을 이용할 수 있다.

본 발명은 상기 비전사 서열 부위에 해당하는 리보솜 유전자 절편 및 상기 시클로헥시미드 저항성 L41 유전자를 이용하여 *파피아* 로도지마에 외래 유전자를 안정적으로 삽입할 수 있고 항생제 내성 표지로 용이하게 선별할 수 있는 형질전환용 벡터를 제작한다 (도 2 참조).

구체적으로, 리보솜 유전자의 비전사 서열 부위 및 56번 아미노산이 글루타민으로 치환되는 돌연변이가 유발된 리보솜 단백질 L41 유전자를 포함하는 *파피아* 로도지

마 형질전환용 벡터 pTPLR1 (수탁번호 : KCTC 0535 BP)를 제공한다.

상기 형질전환용 벡터는 *파피아 로도지마*를 포함하여 모든 효모 균주에 널리 이용할 수 있다.

또한, 본 발명은 *파피아* 속 균주에 외래 유전자를 형질전환시키는 방법을 제공한다. 상기 형질전환방법은 *크립토코커스 네오포르만스* (*Cryptococcus neoformans*)에서 사용한 바 있는 방법을 활용한 것이지만, 효모 균주에 사용하기 적합하도록 세균 유래의 항생제 내성 유전자 대신에 효모 유래의 항생제 내성 유전자를 이용한다.

본 발명의 형질전환 방법은 일렉트로포레이션 (electroporation) 방법을 이용한 것으로, 일렉트로포레이터를 이용하여 다양한 조건에서 형질전환시킬 수 있으나 0.8 ~ 1.2 kV, 400 ~ 800 Ω 또는 25 ~ 50 μF 조건에서 수행하는 것이 바람직하다. 또한 상기 형질전환용 벡터는 일렉트로포레이션을 수행하기 전에 제한효소 등으로 개환시키는 것이 바람직하고, 이 때 제한효소의 종류 또는 개환 방식에 따라 외래 유전자의 삽입을 조절할 수 있으므로 효모 발현에 적합하지 않은 대장균 유전자 등이 삽입되는 것을 배제시킬 수 있다.

상기에서 얻은 형질전환체는 23 $^{\circ}\text{C}$, 14 ~ 16 시간 정도 배양하여 시클로헥시미드가 첨가된 완전 배지에 도달하고 23 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 ~ 5 일 정도 다시 배양하는데, 각각의 조건에 따라 관찰되는 세포 사멸율과 형질전환 효율은 도 5 에 표시하였다. 그 결과, 특히 0.8 kV, 600 Ω , 50 μF 조건에서 가장 많은 형질전환체가 생성되는 것으로 나타났다.

또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 서던 블롯 등으로 분석하여 유전자 삽입 및 형질전환체 생성 양상 등을 조사하였다 (도 3 및 도 4 참조). 그 결과, 상기 형질전환체는 시클로헥시미드가 첨가되지 않은 완전배지에서 여러 세대동안 계대 배양하는 경우에도 삽입된 유전자가 손실없이 안정하게 유지됨을 확인하였다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 범위가 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 파피아 로도지마의 리보솜 단백질 L41 유전자의 분리

본 발명은 파피아 로도지마의 리보솜 단백질 L41 의 게놈 유전자를 분리하기 위하여, 이미 밝혀져 있는 다른 효모 균주의 L41 유전자 염기 서열을 참조하여 프라이머 1 (CYH1) 및 프라이머 2 (CYH3)를 합성하였다.

프라이머 1 (CYH1) : 5'-CGC GTA GTT AAY GTN CCN AAR AC-3'

프라이머 2 (CYH3) : 5'-CCC GGG TYT TGG CYT TYT TRT GRA A-3'

상기 프라이머와 주형으로 파피아 로도지마 (ATCC 24230)의 게놈 DNA 를 사용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 수행하고 이로부터 다른 효모 균주에서 예상되는 크기인 약 200bp 보다 큰 약 700bp 크기의 L41 유전자를 함유하는 절편을 분리하였고, 이를 라벨링하여 하기 과정에서 프로브 (probe)로 사용하였다. 다음 L41 유전자를 클론하기 위하여, 상기에서 제작한 프로브로 여러 종류의 제한효소로 처리한 파피아 로도지마의 게놈 유전자를 서던 블롯하였다. 그 결과, 42℃, 50% 포름아미드 (formamide)의 하이브리다이제이션 (hybridization) 조건에서 프로브에 의해 강한 발

색 (signal)을 나타내는 게놈 유전자를 확인하고 이 중에서 제한효소 *Xba*I 으로 처리된 약 8.0 kb 크기의 유전자 절편을 선택하였다.

상기 유전자 절편은 L41 유전자를 얻기 위한 미니 라이브러리 제조에 이용되는데, 구체적으로 제한효소 *Xba*I 로 처리된 핵 유전자중 7~9 kb 범위의 크기를 가지는 유전자군을 회수하여 다시 플라스미드 벡터 pBluescript SK(+)에 결합시킴으로 라이브러리를 완성하였다. 다음 42℃, 50% 포름아미드의 하이브리다이제이션 조건으로 상기 700 bp 크기의 프로브를 사용하여 다시 서던 블롯하고, 이로부터 8.0 kb 크기에서 강한 발색을 띠는 클론을 선별하였다.

한편 인트론 (intron)이 제거된 L41 유전자의 염기 서열 분석하기 위하여, *파피아* 로도지마의 전체 RNA 를 준비하고 3'-RACE (GIBCO BRL) 및 5'-RACE (AmpliFINDER, CLONTECH) 키트를 이용하여 *파피아* 로도지마 L41 유전자의 cDNA 를 얻었다. 구체적으로, *파피아* 로도지마 균주에서 얻은 전체 RNA 로부터 mRNA 분리 키트 (mRNA isolation Kit, Novagen)를 이용하여 mRNA 를 회수한 다음 상기에서 얻은 8.0 kb 크기의 유전자 절편의 부분 염기 서열을 토대로 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 수행하였다. 이 때 3'-RACE 의 경우는 프라이머 3 을, 5'-RACE 의 경우는 프라이머 4 를 상기 키트의 프라이머 (primer)와 같이 사용하였다.

프라이머 3 : 5'-GGT CAG ACC AAG CAA GTT TTT CAC-3'

프라이머 2 : 5'-GTG AAA AAC TTG CTT GGT CTG ACC-3'

그 결과, 각각 290 bp 및 240 bp 크기 정도의 PCR 절편이 관찰되었고, 이들을 플라스미드 벡터 pT7 Blue 에 클론하여 그 염기 서열을 분석하고 이들이 여러 다른 효

모 균주의 L41 유전자 염기 서열과 매우 높은 유사성이 있음을 확인하였다. 또한 이를 앞서 얻은 8.0 kb 의 L41 유전자의 염기 서열과 비교하여 *파피아 로도지마* L41 유전자의 구조를 분석한 결과, *파피아 로도지마* L41 유전자는 1,223 bp 크기로 구성되어 있으며, 일반적으로 1개의 인트론이 존재하는 다른 효모종과는 달리 6개의 인트론이 존재하는 것으로 밝혀졌다. 그리고 인트론의 5' 시작 부위에는 GTPuNGT 서열이, 3' 말단에는 PyAG 염기 서열이 존재하고 있는데, 이와 유사한 염기 서열은 이미 밝혀져 있는 *파피아 로도지마*의 액틴 (actin) 유전자에도 존재하는 것이 보고되어 있다. 이외에도 *파피아 로도지마* L41 유전자는 106개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 코딩하며, 시클로헥시미드 민감성에 관여하는 프롤린이 56번 위치에 있음이 확인되었다. 상기 *파피아 로도지마* L41 유전자 의 염기 서열은 유전자은행 (GenBank)에 1997년 5월 19일자 등록번호 AF 004672 로 등록하였다 (도 1 참조).

<실시예 2> L41 유전자에 시클로헥시미드에 대한 저항성 부여

본 발명은 L41 유전자에 시클로헥시미드에 대한 저항성을 부여하기 위하여, 부위 지정 변이법 (site directed mutagenesis)을 이용하여 시클로헥시미드 민감성에 관여하는 56번 아미노산인 프롤린을 글루타민으로 변환시키는 변이(mutagenesis)를 시행하였다. 구체적으로 상기 실시예 1 에서 얻은 8.0 kb 크기의 제한효소 *Xba*I 유전자 절편으로부터 56번 프롤린을 포함하는 2.2 kb 크기의 제한효소 *Sal*I 유전자 절편을 분리한 다음 변이 키트 (mutagenesis kit, Quik Change, Stratagene)를 이용하여 시클로헥시미드에 대한 저항성 유전자 (CYH^r)를 획득하였다. 이 때 프롤린 코

돈을 글루타민 코돈으로 변환시킨 하기의 서열을 가지는 프라이머 5 및 프라이머 6 을 사용하였다.

프라이머 5 : 5'-GGT CAG ACC AAG CAA GTT TTT CAC-3'

프라이머 6 : 5'-GTG AAA AAC TTG CTT GGT CTG ACC-3'

<실시예 3> 리보솜 유전자의 분리

본 발명은 *파피아 로도지마*로 형질전환된 유전자가 계놈 유전자 내로 삽입되는 효율을 높이기 위하여, 리보솜 DNA 를 이용하였다. 이 때 사용하는 리보솜 DNA 를 얻기 위하여, 부분적으로 염기 서열이 밝혀진 *파피아 로도지마*의 18S 및 26S 리보솜 DNA 의 염기 서열을 이용하고 18S DNA 의 말단 부위에 해당하는 위치의 프라이머 7 (18A) 및 프라이머 8 (18B) 그리고 26S DNA 의 시작 부위와 말단 부위에 해당하는 프라이머 9 (26 α) 및 프라이머 10 (26 β)을 각각 합성하였다.

프라이머 7 (18A) : 5'-TCC TAG TAA GCG CAA GTC AT-3'

프라이머 8 (18B) : 5'-TTC GGC CAA GGA AAG AAA CT-3'

프라이머 9 (26 α) : 5'-AAT CGG ATT ATC CGG AGC TA-3'

프라이머 10 (26 β) : 5'-GCT ATA ACA CAT CCG GAG AT-3'

이로부터 5.8S 부위를 포함하는 1.5 kb (26 β + 18A)와 5S 부위를 포함하는 6 kb (26 α + 18B) 크기의 리보솜 DNA 의 비전사 서열 (non-transcription sequence, NTS) 부위에 해당하는 유전자 절편을 얻었다. 이 유전자 절편들을 프로브 (probe) 로 이용하여 다양한 제한효소로 처리한 *파피아 로도지마*의 계놈 유전자를 서던 블롯 (Boehringer Mannheim)한 다음 상기 실시예 1 의 과정으로 미니 라이브러리를

제조하고 다시 서던 블랏을 반복 수행함으로써 18S 부위와 NTS 26S 부위를 포함하는 8.5 kb 크기의 제한효소 *Hind*III 절편을 클론하였다. 이 클론된 유전자의 제한효소 *Hind*III - *Xho*I 절편을 플라스미드 벡터 pBluescript SK(+)에 서브클론하여 부분 염기 서열을 분석한 다음, *파피아* 로도지마와 같은 바시디오미세토우스 (Basidiomycetous) 계통의 효모인 *캔디다 네오포르만스*의 5.8S 및 25S 부위 염기 서열과 비교한 결과, 유사성이 매우 높음을 발견하였다. *파피아* 로도지마의 형질전환에 사용한 리보솜 DNA 의 0.7 kb *Xho*I - *Xba*I 유전자 절편의 염기 서열은 유전자 은행 (GenBank)에 1997년 7월 28일자 등록번호 AF 016256 로 등록하였다.

<실시예 4> *파피아* 로도지마 형질전환용 벡터의 제조

본 발명은 상기 실시예에서 얻은 리보솜 DNA 와 56번 아미노산이 글루타민으로 치환된 L41 유전자를 포함하는 *파피아* 로도지마 형질전환용 벡터를 제작하기 위하여, L41 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터 pTPL2 및 부위 지정 변이법으로 시클로헥시미드 저항성을 부여한 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터 pTPL5 그리고 리보솜 DNA 를 포함하는 플라스미드 벡터 pTPR4 를 이용하였다 (도 2 참조). 구체적으로 리보솜 DNA 의 NTS 부위를 포함하는 0.73 kb 크기의 제한효소 *Xho*I-*Xba*I 절편 및 L41 유전자의 3.7 kb 크기의 제한효소 *Xba*I-*Sa*I 절편을 이용하였다. 이 때 리보솜 DNA 는 *파피아* 로도지마의 핵 내로 유전자가 멀티사본수 (multicopy)로 삽입되도록 한다. 상기 0.73 kb 의 리보솜 DNA 는 제한효소 *Ba*I 로 처리하고 이에 크레노 효소 (Klenow)로 처리된 3.7 kb 의 L41 유전자를 삽입시켜 본 발명의 형질전환용 벡터 pTPLR1 을 제작하였다. 이를 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구

소 유전자는 행에 1998년 10월 21일자로 국제기탁하였다 (수탁번호 : KCTC 0535 BP).

또한, L41 유전자의 발현 방향이 상기 벡터 pTPLR1 와 반대인 형질전환용 벡터 pTPLR2 도 제작하였다. 상기와 같은 과정으로 제작한 벡터들은 제한효소 *Sma*I 또는 제한효소 *Bgl*II-*Kpn*I 으로 처리하여 *파피아 로도지마*에 형질전환시킴으로 핵 유전자 내 리보솜 DNA 부위로 삽입되도록 하였다.

<실시예 5> *파피아 로도지마*로의 형질전환

본 발명은 상기 형질전환용 벡터로 *파피아 로도지마* 균주를 형질전환시키기 위하여, *파피아 로도지마*와 같은 바시디오미세토우스 (Basidiomycetous) 계통의 효모인 *크립토코커스 네오포르만스* (*Cryptococcus neoformans*)에 사용된 형질전환방법을 이용하였다 (Varma, et al., *Infect. Immun.*, 60, 1101, 1992). 이는 일렉트로포레이션 (electroporation) 방법을 이용한 것으로, 50 ml YM 배지를 사용하여 균주를 대수기까지 키운 다음, 3,000 rpm 에서 10분 동안 원심분리하고, 1 mM 디티오프레이톨 (dithiothreitol, DTT)을 포함하는 50 ml 일렉트로포레이션 완충용액 (270 mM 슈크로스, 10 mM 트리스, 1 mM MgCl₂, pH 8.0)으로 2번 세척하여 디티오프레이톨이 포함되지 않은 동일한 완충용액을 균주의 농도가 대략 50 μ l 당 $\sim 2 \times 10^7$ 정도 되도록 첨가하였다. 일렉트로포레이터 (Electroporator)는 BIO-RAD GENE PULSER II 를 이용하였고, 0.2 cm 큐벳 (BIO-RAD)에 50 μ l 균주와 벡터 DNA 200 ng 을 함께 섞어 다양한 조건 (0.8 ~ 1.2 kV, 400 ~ 800 Ω , 25 ~ 50 μ F)에서 형질전환시킨 다음, 1 ml YM 배지를 첨가하여 23 $^{\circ}$ C 에서 14 ~ 16 시간 동안 배양하여.

시클로헥시미드가 첨가된 완전 배지에 도달하고 23 °C 에서 4 ~ 5 일간 키워서 형질전환체를 관찰하였다.

각각의 조건에 따라 나타난 세포 사멸율과 형질전환 효율의 결과는 도 5 에 표시하였다. 그 결과를 살펴보면, 동일한 전압과 저항에서도 주어진 μF 에 따라 나타난 형질전환체의 수가 다르게 나타났으며, 일반적으로 25 μF 보다는 50 μF 에서 많은 형질전환체수를 관찰할 수 있었다. 특히 0.8 kV, 600 Ω , 50 μF 조건에서 가장 많은 형질전환체가 생성되었으며, 대략 1 μg 당 800 ~ 1000개의 형질전환체가 형성됨을 확인하였다. 또한 이 조건에서의 펄스의 길이 (pulse length)는 20 ms 전후 정도로 나타났다.

<실시에 6> 서던 블롯에 의한 형질전환체의 분석

본 발명의 형질전환체의 유전적 안정성을 조사하기 위하여, 유전자 삽입 및 형질전환체 생성 양상 등을 서던 블롯으로 분석하였다 (도 3 및 도 4 참조). 상기 형질전환체를 조사한 결과, 특이하게도 벡터 pTPLR2 를 사용하는 경우에 어떤 조건에서도 형질전환체가 발견되지 않았는데, 이는 삽입된 L41 유전자의 전사 방향과 리보솜 DNA 의 전사 방향이 일치하는 경우에만 L41 유전자가 발현됨을 시사하는 것이다. 또한 제한효소를 처리하지 않은 환상 (circular) 형태의 유전자에서도 형질전환체는 발견되지 않았는데, 이는 리보솜 DNA 에 자가 복제 서열 (autonomous replication sequence, ARS) 기능이 존재하지 않는 것에 기인된 것이라 추정된다. 한편 염색체 내로의 유전자 삽입을 위하여 리보솜 DNA 없이 L41 유전자만을 이용하여 형질전환하는 경우, 조사된 형질전환체의 수는 적었지만 형질전환체는 관찰되었

는데, 이와 같은 결과는 상기 이용된 L41 유전자가 어떤 특정 부위에 삽입되기 보다는 핵 유전자 내에 존재하는 기존의 L41 유전자와 치환됨으로써 삽입이 이루어지는 것을 나타낸다. 또한, 상기 실험에 이용된 유전자중 프로모터 (promoter) 부위가 제거된 L41 유전자에서도 형질전환체는 관찰되었고, 형질전환체의 서던 블럿에서 대조군 (control)으로 이용된 게놈 유전자와 별다른 차이가 없었다. 형질전환체의 유전자 삽입 여부를 확인하기 위한 서던 블럿에서 제한효소 *Bgl*I - *Kpn*I 으로 처리된 유전자에서 얻은 형질전환체의 게놈 유전자를 분리하고 제한효소로 처리한 다음 2.2 kb의 제한효소 *Sa*I 유전자 절편을 프로브로 사용하여 유전자 삽입 여부를 확인하였다. 그 결과, 형질전환체 게놈 유전자를 제한효소 *Sma*I 으로 처리하여 서던 블럿한 군의 9.0 kb 및 4.1 kb 위치에서 발색 절편 (band)이 관찰되었는데, 9.0 kb 발색 절편 (band signal)은 대조군 (control)으로 사용된 형질전환되지 않은 *파피아 로도지마* 게놈 유전자에서도 발견되는 것으로 보아 *파피아 로도지마* 게놈 유전자 내에 존재하는 본래의 L41 유전자로 추정된다. 9.0 kb 절편보다 더 진하게 관찰되어지는 4.1 kb 절편은 예상되는 절편 크기 (3.7 kb L41 유전자 + 0.4 kb 리보솜 DNA)로서 대조군에서 관찰되지 않으므로 본 발명의 벡터가 핵 유전자 내로 삽입되었음을 알 수 있었다. 또한, 스캐닝 덴시토미터 (Scanning densitometer, Model GS-700 Imaging Densitometer, BIO-RAD)를 사용하여 4.1 kb 절편의 강도 (intensity)를 대조군과 비교한 결과, 대략 7 사본수 정도가 존재하는 것을 알 수 있었다. 제한효소 *Eco*RI 으로 처리한 또 다른 서던 블럿의 결과에서는 9.0 kb, 5.8 kb, 2.8 kb 크기의 절편이 나타났으며, 5.8 kb 절편은 3.2 kb 리보솜 DNA 와 2.6

kb L41 유전자로부터, 2.8 kb 절편은 1.7 kb 리보솜 DNA 와 1.1 kb L41 유전자로부터 파생된 것으로 보이며, 9.0 kb 절편은 대조군에서도 관찰되는 것으로 보아 게놈 유전자 내에 존재하는 L41 유전자로 추정된다. 이와 같은 결과는 리보솜 DNA 를 프로브를 이용하는 경우에도 동일하게 나타났다. 이외에도 상기에서 얻은 형질전환체는 시클로헥시미드가 첨가되지 않은 완전배지에서 여러 세대동안 계대 배양하는 경우에도 삽입된 유전자가 손실없이 안정하게 유지되었다.

【발명의 효과】

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 *파피아 로도지마* (*Phaffia rhodozyma*) 형질 전환용 벡터는 리보솜 유전자를 포함하여 *파피아 로도지마*의 염색체 내로 외래 유전자를 안정적으로 삽입할 수 있고, 또한, 시클로헥시미드 저항성 L41 유전자를 포함하여 형질전환체가 용이하게 선별되게 한다. 이러한 벡터를 *크립토코커스 네오포르만스* (*Cryptococcus neoformans*)에서 사용된 일렉트로포레이션 방법으로 *파피아 로도지마*에 형질전환시키는 방법은 앞으로 천연색소 아스타잔틴의 대량 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

[서 열 목 록]

서열번호 : 1

서열의 길이 : 1223

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 2본쇄

형태 : 선형

서열의 종류 : 게놈 유전자

【서열 1a】

ATGGTCAACG TTCCAAGAC TCGACGTGAG TTATAGCAAT TTCAACAAC	CTCCAGACGA	60
CAAATATTCC AGTGCATCGA AAGAGTTTGT GGATAAACGC GACAGTTTCA	AGGGAAAGAG	120
TCGATGGACA GATTTGGAAG ACTTAGCCGG TCAAGGAACT TGGGGATCAC	GTGGCGGAGG	180
ACTCATCAGA AGAAGTCGGG ATTTGTTTGA TCATAGTGGG ATCAAGACAA	ACTGGAGGAT	240
ATGGCTCGCC TTGGAAGGA ATCTCCGGCC TGGATTCGAG GATCCGAAAG	TTGTACGTAT	300
GGAAAAGCTT ACACGGCTTG GATTTATTAT CTTTCATAGG AACCTACTGC	AAGGGTAAGG	360
CTTGCAAGAA GCACACGTAA GTCGCTTATC CTCTCCACTC TTTCATGGCA	TATTGTCAAC	420
GACTGGACAA CGCGTCCGTT TTGAAACAAG TGACTIONCT GTGAAATTG	ATTCTACACC	480
TGTATTTAGC CCTCACAAGG TACATATCAC ATCCTCCAC CCCACCCTGC	CCAACCTCTT	540
CAGTTCATCT TGCTCTCGGT TTCCACATTC CCTGATGACC TCCTTGTATG	TTCTTTGCGA	600
ACGTTTGTTT CTGTTTCTGT AGGTGACCCA GTACAAGAAG GGAAAGGACT	CCATCTTCGC	660
CCAGGGAAAG CGACGATACG ACCGAAAGCA GTCCGGTTAC GGAGGTCAGA	CCAAGCCCGT	720

【서열 1b】

TTCCACAAG AAGGCTAAGA CCACCAAGAA GGTCGTCCTT CGATTGGGTA CGTTTTTGTT 780
 TATTTTGAAT TCTTTTGTG TATGCAGACT TTTGATGATT ATGCTCCTCT GTCGTTTTTT 840
 CTCTTCAAAC AGAGTGCTCC GTCTGCAGTT CGTTCTTCTT TCCAACCAA ACTTCAACTA 900
 CAGACATCAT AAACAGACAT CTTACTTCGG TGTCTCTCT TTTTTCCGC AGAGTACAAG 960
 ATGCAGATGA CCCTCAAGCG ATGCAAGCAC TTCGAGCTTG GAGGAGACAA GAAGACCAAG 1020
 GGTTCTCTT TTGTCCATAT ATTCTCTGGT TCACTTCTTA TGTCTCTAAC GTACTTGTTT 1080
 CCTTTTTGGT TCGGATGTTG TTTCTATCGG TGGTGTTC TTTCTTTGG ATGCATTATC 1140
 ATTTATCGTG TTGGACTGTT TTCCTCTGCT CGTTTCTTC TCCTCTGTAC TTGTGCTTCT 1200
 CAGGAGCCGC CATCTCTTC TAA 1223

[서열 목록]

서열번호 : 2

서열의 길이 : 350

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 2본쇄

형태 : 선형

서열의 종류 : cDNA

【서열 2】

CCCTTCAAGT CTCGTCTCAA TCAGTCAAGA TGGTCAACGT TCCCAAGACT CGACGAACCT	60
ACTGCAAGGG TAAGGCTTGC AAGAAGCACA CCCCTCACAA GGTGACCCAG TACAAGAAGG	120
GAAAGGACTC CATCTTCGCC CAGGGAAAGC GACGATACGA CCGAAAGCAG TCCGGTTACG	180
GAGGTCAGAC CAAGCCCGTT TTCCACAAGA AGGCTAAGAC CACCAAGAAG GTCGTCCTTC	240
GATTGGAGTG CTCCGTCTGC AAGTACAAGA TGCAGATGAC CCTCAAGCGA TGCAAGCACT	300
TCGAGCTTGG AGGAGACAAG AAGACCAAGG GAGCCGCCAT CTCTTTCTAA	350

[서 열 목 록]

서열번호 : 3

서열의 길이 : 106

서열의 형 : 아미노산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 선형

서열의 종류 : 리보솜 단백질

【서열 3】

M	V	N	V	P	K	T	R	R	T	Y	C	K	G	K	A	16
C	K	K	H	T	P	H	K	V	T	Q	Y	K	K	G	K	32
D	S	I	F	A	Q	G	K	R	R	Y	D	R	K	Q	S	48
G	Y	G	G	Q	T	K	P	V	F	H	K	K	A	K	T	64
T	K	K	V	V	L	R	L	E	C	S	V	C	K	Y	K	80
M	Q	M	T	L	K	R	C	K	H	F	E	L	G	G	D	96
K	K	T	K	G	A	A	I	S	F	*						106

[서 열 목 록]

서열번호 : 4

서열의 길이 : 741

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 2본쇄

형태 : 선형

서열의 종류 : 리보솜 유전자

【서열 4a】

CTCGAGTGGA CGGTGGCAAT GGCATTCTGT TCGTTGGTGC TCACTCGCAA CCCAAGCAGT 60
 CGCTTACCCG GGGTAGCCTC CGGGTGGGCG CGATGATTG TGGTGTGGAT TCCTTCCCTA 120
 TGGGTAGAAC GACGCGCAAC CAATCATTCTG GAGAACCGCT CCGTTGTAGC CGACCAGTCT 180
 GATTGATCAA CATGCCAGCA CGTCTCCGG GACGGAGACT GCGGGGATC GTACCTCATC 240
 TGAATCGCT GGCTCAATGG TAGTAGTCTT CACGATCGGC CATGAGGGCA GTCTAGGTGG 300
 GTTCGCCTGC CGAAGACTGT GTGAGTGTGC TGANAATAA TTGAGTACCG GGGGATAAGG 360
 CAAGGCGTGT NTGGTTGCCG GTGGCTGTGA GCGAGTTTGC TGCAAAGCGA TTCAATGCAC 420
 CCCGGCTTGG CCAGCGCGCT GCGTCACGAA ACACATAAA CCGTTGACGC CATAAAGTAA 480
 TAACACACTC AAGTTTGTGG TCCCGGGTGG GCCTCTGTGC CTGCGTGGGA CCCGACGGGA 540
 GAGGAAAACG TTCTGTGGCC CTCTCCTCTG TGGATAGTTA CCTGGTTGAT CCTGCCAGTA 600
 GTCATATGCT TGTCTCAAAG ATTAAGCCAT GCATGTCTAA GTATAAACAA ATTCATACTG 660

【서열 4b】

TGAAACTGCG AATGGCTCAT TAAATCAGTT ATAGTTTATT TGATGGTACC TTGCTACATG 720
 GATAACTGTG GTAATTCTAG A 741

【특허청구범위】

【청구항 1】

파피아 로도지마 (*Phaffia rhodozyma*) 유래의 리보솜 단백질 L41 유전자.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 서열 1 의 게놈 유전자 염기 서열을 포함하고, 그의 cDNA 는 서열 2 의 염기 서열을 가지는 L41 유전자.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, *파피아 로도지마* 유래의 리보솜 단백질의 56번 아미노산이 글루타민으로 치환되는 돌연변이가 유발된 L41 유전자.

【청구항 4】

서열 4 의 염기 서열을 가지는 비전사 서열 부위를 포함하는 *파피아 로도지마* 유래의 리보솜 유전자.

【청구항 5】

시클로헥시미드 (cycloheximide) 저항성 표지 유전자 및 *파피아 로도지마* 유래의 리보솜 유전자를 포함하는 *파피아 로도지마* 형질전환용 벡터.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 시클로헥시미드 저항성 유전자는 제 3항의 L41 유전자이고, 리보솜 유전자는 제 4항의 비전사 부위인 것을 특징으로 하는 *파피아 로도지마* 형질전환용 벡터 pTPLR1 (수탁번호 : KCTC 0535 BP).

【청구항 7】

시클로헥시미드 (cycloheximide) 저항성 유전자 및 *파피아* *로도지마* 유래의 리보솜 유전자를 포함하는 형질전환용 벡터를 이용하여 일렉트로포레이션 과정으로 *파피아* *로도지마* 균주를 형질전환시키는 방법.

【청구항 8】

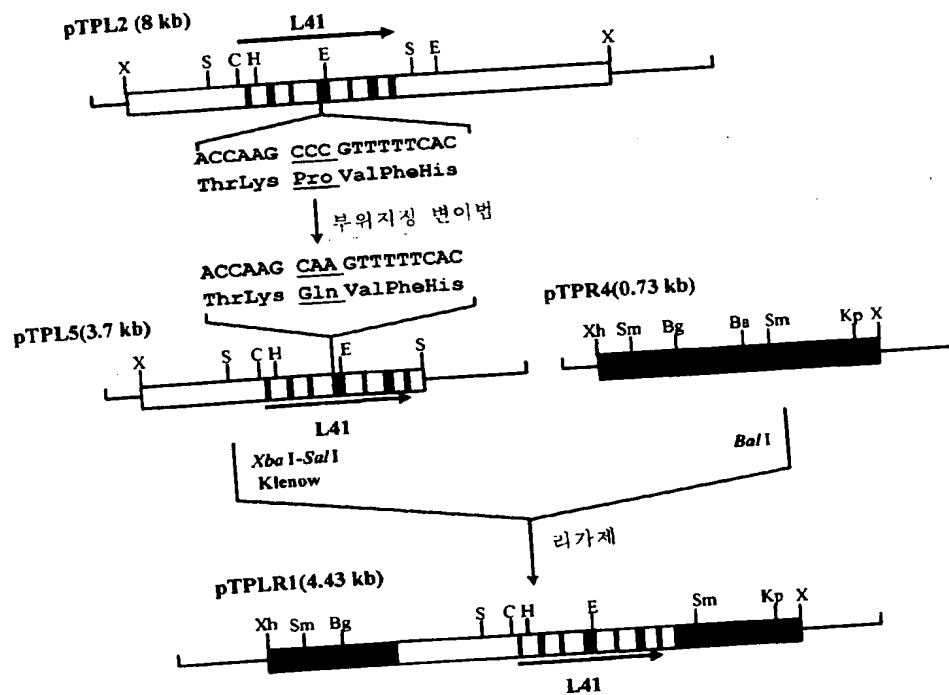
제 7항에 있어서, 제 5항의 형질전환용 벡터를 제한효소로 처리하여 개환시킨 다음 0.8 ~ 1.2 kV, 400 ~ 800 Ω , 25 ~ 50 μ F 조건에서 일렉트로포레이션을 수행하여 *파피아* *로도지마* 균주를 형질전환시키는 방법.

【도면】

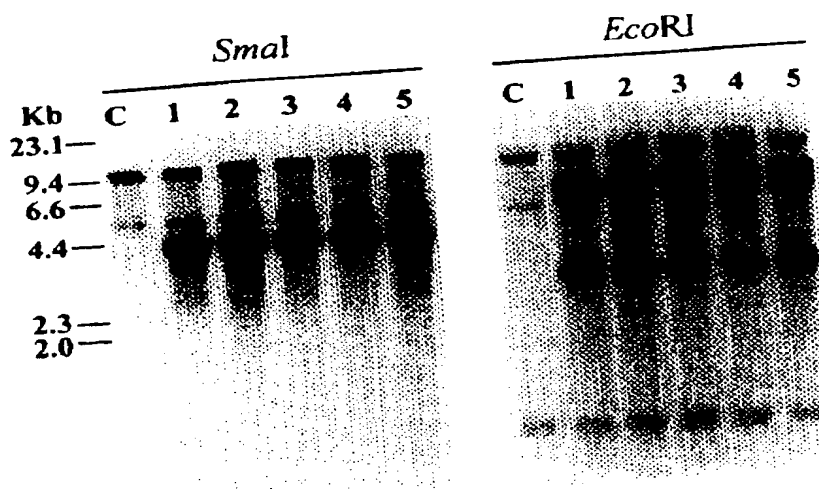
【도 1】

-704 AAGAGCTATTGGAATGACGACCACAAGAGTGACGATCATATTGAGCATAGTATACCAAAGGCCAAGAGGC
-634 TGTGTGGTGTCTATGAGTGGCCTTGATTATGTGTACATAAATAAACTGATCTCAATTTTCAAATACT
-564 TGCCAACACTTTCTATATTCACACCAAAAAAAGTCAGATTGGCCCAAAAGTCAGATACAGCTCGATC
-494 GTCGACGGGTTCAAGCACTTTGTGAGGCGAAAGAAAGGCCACAGCACCACCCTTCAAGTCTCGTCTCAAT
-424 CAGGTTTCGTCTAGCTTTTTGTGTGCAAGGATTACCGTCTTGATGGATTGTTCGTTGAAAGAGAGGAAA
-354 GAACATGCTGAAGTACGAAAGTGTGAACAAAAAATTGTGATTTTTTCATTGTGTTTCGCTGGTCTCCTT
-284 GCTGGGTTGGGTTGGATCGGATTTATCTTCTGTGTTGGATGGAAAACCTGAATGTTCTTTTCTGGACA
-214 TCTTCTAAACTCGACAAAACGATTCATTCTCCGTACTGCTCTGGTTCTGCCTTTTGAATCGCATCGAT
-144 AAATCTTCCCTCGGAACGTTTCGATCAATCTCCGTCAAACCTATCATCCAAAAATCTCTTCTCGACTGCC
-74 GCCTTGCTCCTTTTCTCGTTCTTTCTTAATCCGCTTTTCGACTACCCTCCTTCTCTTCACTCATAGT
-4 CAAG ATG GTC AAC GTT CCC AAG ACT CGA CGTGAGTTATAGCAATTCAACAACTCTCCAGA
M V N V P K T R R
53 CGACAAATATTCAGTGCATCGAAAGAGTTTGTGGATAAACCGCGACAGTTTCAAGGGAAGAGTCGATGG
123 ACAGATTTGGAAGACTTAGCCGGTCAAGGAACCTTGGGGATCACGTGGCGGAGGACTCATCAGAAGAAGTC
193 GGGATTTGTTTGATCATAGTGGGATCAAGACAAACTGGAGGATATGGCTCGCCTTGAAGGGAATCTCCG
263 GCCTGGATTTCGAGGATCCGAAAGTTGTACGTATGGAAAAGCTTACACGGCTTGGATTATTATCTTTTCA
333 AGGA ACC TAC TGC AAG GGT AAG GCT TGC AAG AAG CAC ACCTAAGTCGCTTATCCTCTC
T Y C K G K A C K K H T
391 CACTCTTTTCATGGCATATTGTCAACGACTGGACAACGCGTCCGTTTGAACAAGTGACTTACCTGTGAA
461 ATTGATTCTACACCTGTATTAGC CCT CAC AAG GTACATATCACATCTCCACCCACCCTGCC
P H K
527 CAACTTCTTCAGTTTCATCTTGCTCTCGGTTTCCACATTCCCTGATGACCTCCTTGTATGTTCTTTGCGAA
597 CGTTTGTCTTCTGTTTCTGTAGGTG ACC CAG TAC AAG AAG GGA AAG GAC TCC ATC TTC G
V T Q Y K K G K D S I F A
655 CC CAG GGA AAG CGA CGA TAC GAC CGA AAG CAG TCC GGT TAC GGA GGT CAG ACC
Q G K R R Y D R K Q S G Y G G Q T
708 AAG CCC GTT TTT CAC AAG AAG GCT AAG ACC ACC AAG AAG GTC GTC CTT CGA TT
K P V F H K K A K T T K K V V L R L
761 G GGTACGTTTTTGTGTTTATTTGAATCTTTTTGTGTATGCAGACTTTTGATGATTATGCTCCTCTGTGC
E
830 TTTTTTCTCTCAAACAGAG TGC TCC GTC TGC AGTTCGTTCTTCTTCCAACCAAACTTCAACT
C S V C K
895 ACAGACATCATAAACAGACATCTTACTTCGGTGTCTCTCTTTTTTCCGCAGAG TAC AAG ATG CA
Y K M Q
961 G ATG ACC CTC AAG CGA TGC AAG CAC TTC GAG CTT GGA GGA GAC AAG AAG ACC
M T L K R C K H F E L G G D K K T
1013 AAG GGTTCGTCTTTTGTCCATATATTCTCTGGTTCACTTCTTATGTTCCCTAACGTACTGTGTTCCCTTT
K G
1082 TGGTTTCGGATGTTGTTTCTATCGGTGGTGTGTTTCTTTTCTTTGGATGCATTATCATTATCGTGTGGAC
1152 TGTTTTCTCTGCTCGTTTCTTCTCTCTGTACTGTGCTTCTCAGGA GCC GCC ATC TCT TTC
A A I S F
1216 TAA ATGTTGTTTTAACCCCGTCTCCACCATATGTCAAATCGGCATGCGGTTGTCCCTTCCAATC
*
1285 AGTCGTTTCCATGCTCGAGATACTTCTTGGACGTTCTTGGGAGCAATTACACATCGAGAAAATACCCA
1355 AAAAACCACGCACCCCTTTTATTTCAATGGGAGATCTGGATCTATGTATCATGTGATTTCTATTTT
1425 CCAAAACCCATTGATTGTTTCTCTCTTAAGAGTAACATCTTTTCCAAGATACTTCTC

【도 2】



【도 3】

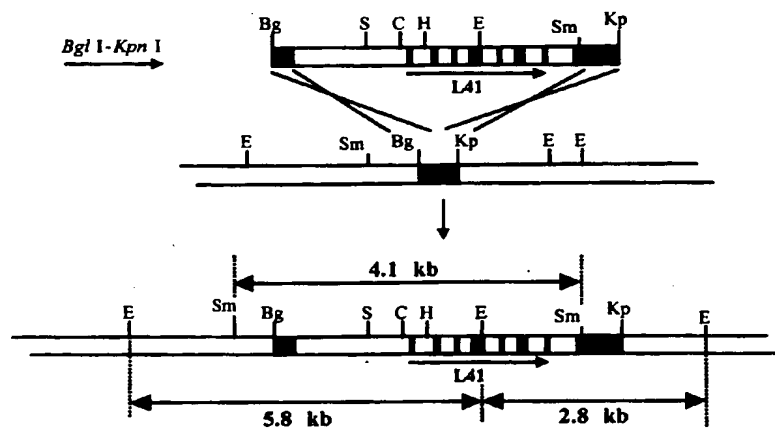


【도 4】

pTPLR1(4.43 kb)

Bgl I - *Kpn* I

리보솜 DNA



【도 5】

